



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Carrera de Ingeniería Agronómica

TÍTULO:

Efecto del ácido salicílico en la inducción de la resistencia en tomate de árbol
(*Solanum betaceum*) a la antracnosis y caracterización molecular.

Trabajo de Titulación previo a la obtención del

Título de Ingeniero Agrónomo

AUTOR: Rolendio Anibal Cabrera Cabrera

C.I: 0105373625

rolendio.anibal@gmail.com

DIRECTOR: Ing. Patricio Salvador Castro Quezada. Ph D.

C.I: 1103411151

CUENCA-ECUADOR

07 de enero de 2021



RESUMEN

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es una especie de origen andino, que posee un gran potencial debido a sus características organolépticas. Sin embargo, es muy susceptible a la presencia de la antracnosis cuyo agente causal pertenece al complejo *Colletotrichum acutatum*. Esta investigación fue realizada en campo y laboratorio. En el campo se evaluó el efecto del ácido salicílico (AS) en tomate de árbol contra la antracnosis. Para cumplir con este objetivo se evaluó el efecto del ácido salicílico en tres concentraciones (0.1, 0.2, y 0.4 mM). La aplicación se realizó directamente en el cultivo. Para esto, se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con 10 repeticiones y un testigo. También se caracterizó molecularmente 16 cepas del complejo *Colletotrichum acutatum* provenientes de las provincias de Azuay y Loja mediante análisis multilocus por PCR, en base a primers definidos en los genes de actina, β -tubulina, y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Para el efecto del AS en la inducción de la resistencia se obtuvieron los siguientes resultados: la concentración 0.2 mM mostró resultados significativos al disminuir la severidad de antracnosis en los frutos; la concentración 0.1 mM tuvo efectos significativos al reducir la severidad de antracnosis en las hojas frente a las plantas testigo y la incidencia de antracnosis en hojas. Además, la concentración de 0.4 mM mostró un mayor desprendimiento de hojas y frutos con tejido contaminado, como un mecanismo de defensa contra la enfermedad en comparación con el testigo. En cuanto al análisis molecular por multilocus, se demostró que la especie responsable para antracnosis en tomate de árbol es *Colletotrichum tamarilloi* que pertenece al complejo *Colletotrichum acutatum*.

Palabras clave: Ácido salicílico. Marcadores moleculares. Multilocus. Resistencia.

Tomate de árbol.



ABSTRACT

The tree tomato (*Solanum betaceum*) is a species of Andean origin, which has great potential due to its organoleptic characteristics. However, it is very susceptible to the presence of anthracnose whose causal agent belongs to the complex *Colletotrichum acutatum*. This research was conducted in the field and laboratory. In the field, the effect of salicylic acid (AS) in tree tomato was evaluated against anthracnose. To fulfill this objective, the effect of salicylic acid was evaluated in three concentrations (0.1, 0.2, and 0.4 mM). The application was made directly in the crop. For this, a completely randomized block design with 10 repetitions and a control was used. It was also molecularly characterized 16 strains of *Colletotrichum acutatum* complex from Azuay and Loja provinces through multilocus analysis by PCR, based on primers defined in actin genes, β -tubulin, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The following results were obtained for the effect of AS in resistance induction: 0.2 mM concentration showed significant results when anthracnose severity in fruits was reduced; 0.1 mM concentration had significant effects when anthracnose severity in leaves was reduced in front of control plants and anthracnose incidence in leaves. Besides, the 0.4 mM concentration showed a higher leaf and fruit shedding with contaminated tissue as a defense mechanism against the disease compared to the control. Regarding the molecular analysis by multilocus, it was demonstrated that the species responsible for anthracnose in tree tomato is *Colletotrichum tamarilloi*, which belongs to the *Colletotrichum acutatum* complex.

Keywords: Salicylic acid. Molecular markers. Multilocus. Resistance. Tree tomato.



INDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	10
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN	16
2. OBJETIVOS	18
3. HIPÓTESIS.....	18
4. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	19
4.1. Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>).	19
4.1.1. Origen.....	19
4.1.2. Descripción botánica.....	19
4.1.3. Tomate de árbol en Ecuador.....	20
4.2. Antracnosis	21
4.3. Caracterización molecular por multilocus	21
4.4. Resistencia Sistémica Adquirida (RSA).....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. Área de estudio	25
5.2. Materiales.....	26
5.3. Métodos	27
5.3.1. Metodología para la investigación experimental del objetivo 1	27
5.3.1.1. Diseño experimental	29



5.3.2. Metodología para la investigación experimental del objetivo 2	30
5.3.2.1. Toma de ADN de antracnosis.....	30
5.3.2.2. Caracterización molecular	31
6. RESULTADOS	33
6.1. Efecto del ácido salicílico en la inducción de la resistencia frente a la antracnosis	33
6.1.1. Severidad en hojas.....	33
6.1.2. Incidencia en Frutos	35
6.1.3. Incidencia en hojas	36
6.1.4. Severidad en frutos.....	37
6.1.5. Desprendimiento de hojas con antracnosis.	39
6.1.6. Desprendimiento de frutos con antracnosis.	39
6.2. Caracterización molecular de la especie responsable de la antracnosis por multilocus.....	41
6.2.1. Amplificación molecular con ACT (F y R)	41
6.2.3. Amplificación molecular con TUB2 (F y R)	42
6.2.4. Amplificación molecular con GAPDH (F y R).....	42
7. DISCUSIÓN	44
8. CONCLUSIONES	48
9. RECOMENDACIONES	49
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50
11. FOTOS	54



12. ANEXOS.....	56
-----------------	----



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales usados en el desarrollo de la investigación.....	26
Tabla 2. Concentración de ácido salicílico usado por tratamiento.	27
Tabla 3. Escala de severidad en antracnosis.....	28
Tabla 4. Primers específicos para la determinación de la especie de <i>Collectotrichum</i> sp.	31
Tabla 5. Pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk modificado) para cada variable.....	33
Tabla 6. Análisis de varianza de la severidad de antracnosis en hojas.....	34
Tabla 7. Comparación de medias con Duncan de la severidad de antracnosis en hojas.	34
Tabla 8. Análisis de varianza de la incidencia de antracnosis en frutos.....	36
Tabla 9. Prueba de Kruskal Wallis en la incidencia de antracnosis en hojas.	36
Tabla 10. Comparación de a pares con Kruskal Wallis en la incidencia de antracnosis en hojas.....	36
Tabla 11. Prueba de Kruskal Wallis en la severidad en frutos.	37
Tabla 12. Comparación de a pares con Kruskal Wallis en la severidad en frutos.....	37
Tabla 13. Prueba de Kruskal Wallis en desprendimiento de hojas con antracnosis.....	39
Tabla 14. Comparación de a pares con Kruskal Wallis en desprendimiento de hojas con antracnosis.	39
Tabla 15. Prueba de Kruskal Wallis en desprendimiento de frutos con antracnosis.....	40
Tabla 16. Comparación de a pares con Kruskal Wallis en el desprendimiento de frutos con antracnosis.	40
Tabla 17. Temperatura ambiental del Canto de Guachapala.....	40

INDICE DE DIAGRAMAS.

Diagrama 1. Representación de la ubicación de cada tratamiento y testigo a evaluar. ..	30
--	----



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.	25
Figura 2. Mapa de ubicación del lote del cultivo de tomate de árbol.	26
Figura 3. Efecto del AS por cada tratamiento con una concentración de 0.1 mM (A), 0.4 mM (B), 0.2 mM (C) y Testigo (D).	35
Figura 4. Efecto del AS por cada tratamiento con una concentración de 0.2 mM (A), 0.4 mM (B), 0.1 mM (C) y Testigo (D).	38
Figura 5. Escala de severidad en frutos de acuerdo al diámetro del tejido contaminado.	38
Figura 6. Amplificación de 4 muestras de ADN con primers de actina. M : peso molecular, B : control, Muestras de Azuay (2.1, 2.3 y 4.1), Muestras de Loja (7.2); Gel de agarosa al 0.5 % en buffer TAE1X, y tinción con bromuro de etidio.	41
Figura 7. Amplificación de 4 muestras de ADN con primers de β -tubulina. M : peso molecular, B : control, Muestras de Azuay (2.5 y 4.1), Muestras de Loja (7.2 y 9.2); Gel de agarosa al 0.5 % en buffer TAE1X, y tinción con bromuro de etidio.	42
Figura 8. Amplificación de 4 muestras de ADN con primers de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. M : peso molecular, B : control, Muestras de Azuay (2.5 y 4.1), Muestras de Loja (7.2 y 9.2); Gel de agarosa al 0.5 % en buffer TAE1X, y tinción con bromuro de etidio.	43

ECUACIONES

Ecuación 1. Incidencia de la enfermedad.	27
Ecuación 2. Severidad de la enfermedad.	28



INDICE DE FOTOS

Foto 1. Plantación experimental de cultivo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>). ..	54
Foto 2. AS pesado en balanza de precisión para cada respectiva concentración a evaluar.	54
Foto 3. Bomba empleada para la aplicación de AS en frutos y hojas.	54
Foto 4. Evaluación molecular por análisis multilocus.....	55

INDICE DE ANEXOS

Anexos 1. Registro de toma de datos para las variables a evaluar.	56
--	----



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

ESPAC: Encuestas de Superficie y Producción Agropecuaria Continua

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)

ITS: Espaciador transcrito interno (Internal transcribed spacer)

INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

AS: Ácido salicílico

AGROCALIDAD: Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro

ACT: Actina (Actin)

TUB2: Beta-tubulina (Beta-tubulin)

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

RSA: Resistencia sistémica adquirida

PR: Proteínas relacionadas con la patogénesis (Proteins related to pathogenesis)

CC-NBS-LRR: Bobina enroscada - Sitio de unión de nucleótidos - repeticiones ricas en leucina (Coiled coil -Nucleotide binding site-Leucine-rich repeats)



TIR-NBS-LRR: Toll/ receptor de interleucina - Sitio de unión de nucleótidos - repeticiones ricas en leucina (Toll / interleukin receptor - Nucleotide binding site - Leucine rich repeats)

TAE: Tris acetato de ácido etilendiaminotetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid tris acetate)

dNTPs: Nucleósido trifosfato (Nucleoside triphosphate)

mM: milimolar



Cláusula de Propiedad Intelectual

Rolendio Anibal Cabrera Cabrera, autor del trabajo de titulación **“Efecto del ácido salicílico en la inducción de la resistencia en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) a la antracnosis y caracterización molecular.”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 07 de enero de 2021

Rolendio Anibal Cabrera Cabrera

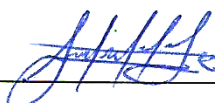
C.I: 0105373625

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Rolendio Anibal Cabrera Cabrera en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“Efecto del ácido salicílico en la inducción de la resistencia en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) a la antracnosis y caracterización molecular.”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 07 de enero de 2021



Rolendio Anibal Cabrera Cabrera

C.I: 0105373625



AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy encarecida a mi tutor de tesis el Ing. Patricio Castro PhD. por haberme brindado su apoyo incondicional, dedicación, y orientación en el transcurso de la realización de este tema de tesis, como también a su sabiduría que mediante de ello me ha sabido aconsejar y darme su apreciada amistad. Agradezco también a los Ing. Walter Larriva, Ing. Luis Minchala, Ing. Pablo Borja, e Ing. Lourdes Diaz por formar parte en la ejecución de este trabajo, asimismo al Ing. Carlos Feicán por interceder por mí hacia el Sr. Luis Caracondo quien amablemente me permitió realizar mi tesis práctica en su hermosa finca y a todos los docentes que tuve la oportunidad de conocerlos y supieron forjarme con sus conocimientos durante mi transcurso de preparación profesional.

Rolendio Cabrera C.



DEDICATORIA

Dedico esta tesis hacia mi madrecita María Cabrera, y mis hermanos quienes han estado a mi lado brindándome día a día su apoyo incondicional hacia un camino profesional que siempre he soñado, y a todas las personas que estuvieron brindándome su apoyo moral en especial a mi compañera de vida Mariuxi Ávila por animarme en cada momento, y a quienes me permitieron conseguir esta meta tan anhelada.

Rolendio Cabrera C.



1. INTRODUCCIÓN

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*), es un cultivo cuyo origen es de la Región Andina y es cultivado en Ecuador, Perú y Colombia; además se ha extendido a países como Brasil, Nueva Zelanda, Kenia, Sudáfrica, India y Sri Lanka. Es consumido en dulces, jugos, mermeladas, jaleas, helados y compotas; de esta manera apetecido en el mercado y aceptado por parte de la población (García y col., 2002).

En Ecuador se cultivan 3 443 ha con una producción anual de 22 343 Tm a nivel nacional, en cuanto que las regiones productoras son la Sierra con una producción anual de 22 335 Tm y la Amazonía con una producción anual de 7 Tm. En la provincia del Azuay existe 205 ha con una producción anual de 788 Tm de este cultivo dentro de la región Sierra, sin embargo, la provincia que más destaca es Imbabura con una superficie cultivada de 1 454 ha y con una producción anual de 6 917 Tm, en comparación con el resto de provincias (ESPAC, 2018).

La principal enfermedad que ataca a *Solanum betaceum* es la antracnosis en hojas y frutos causada por el hongo que pertenece al complejo *Colletotrichum acutatum*. En Ecuador se ha determinado que los eco tipos destinados mayoritariamente al área comercial tanto como los anaranjados y los morados son susceptibles al patógeno, y pueden alcanzar pérdidas entre el 60 y 100% de la producción (Viera y col., 2016).

Sin embargo, el desconocimiento preciso del agente causal de la antracnosis, así como la falta de variedades resistentes ha hecho que el uso de fungicidas químicos ocupe el primer lugar como medida de control de la antracnosis, estableciendo una serie de fungicidas con ingredientes activos como: captan, tiram, benomilo, propiconazol, cyprodinil, azoxystrobin y pyraclostrobin (Barbora y col., 2015). Además, el uso indiscriminado e inadecuado con productos químicos, ha ocasionado la evolución de



cepas con alta resistencia a los fungicidas y con una mayor letalidad en el cultivo, como los del grupo benzimidazol (Barbora y col., 2015).

Una de las alternativas dentro del manejo integrado de plagas y enfermedades para evitar el uso indiscriminado de productos químicos, mitigando la enfermedad de forma natural y a la vez evitando el uso excesivo de fungicidas reduciendo el riesgo en la salud humana y medioambiental, es el uso de ácido salicílico (AS) conocido por ser uno de los precursores en la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA), que actúa como un mecanismo de amplio de protección ante los patógenos y otros factores de estrés abiótico, incrementando la resistencia a nivel genético (Vázquez y col., 2012).

Adicionalmente, como parte de una estrategia de control integral actualmente se incluye la confirmación por métodos moleculares la identificación precisa del agente causal. En el Ecuador, estudios realizados por Freeman y col (1998) lo ha definido como *Colletotrichum acutatum* o *Colletotrichum gloeosporoides*, pero estudios realizados con marcadores moleculares con muestras del Callejón Interandino definieron que el agente causal es *Collectotrichum tamarilloi*, dentro del complejo *Colletotrichum acutatum* (Caicedo y col., 2017), cuyo estudio solamente incluyó 3 muestras de las provincias de Loja y Azuay. Estudios complementarios de caracterización morfológica y molecular de 16 zonas productoras de tomate de árbol dieron como resultado que el agente causal para antracnosis pertenece al complejo *Collectotrichum acutatum* (Castro y col., 2019), pero en este estudio por PCR se incluyó solamente la región ITS. Con esta investigación el presente estudio tiene como finalidad corroborar la información investigada anteriormente y determinar el agente causal para antracnosis en el cultivo de tomate de árbol para las provincias de Azuay y Loja.



2. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto del ácido salicílico en la resistencia a la antracnosis en tomate de árbol y caracterizar molecularmente el patógeno.

Objetivos específicos

- Evaluar tres concentraciones de ácido salicílico como inductor de la resistencia sistémica adquirida contra la antracnosis.
- Caracterizar molecularmente el género *Colletotrichum* mediante análisis multilocus por PCR para identificar la especie responsable de la antracnosis.

3. HIPÓTESIS

Ho: Ninguno de los tratamientos aplicados en tomate de árbol inducido con ácido salicílico presentan resistencia a la antracnosis.

Ha: Al menos uno de los tratamientos aplicados en tomate de árbol inducido con ácido salicílico presenta resistencia a la antracnosis.



4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. Tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

Este cultivo está confinado a pequeños y medianos productores, contribuyendo a la economía campesina por ser un frutal que contiene características organolépticas, alto contenido de ácido ascórbico, provitamina A, carotenoides, vitaminas B6, C, E; es un antioxidante y minerales “Fe, Ca, P” (Sandoval, 2014).

4.1.1. Origen

El tomate de árbol más conocido internacionalmente como tamarillo, es originario de los Andes de Ecuador, Perú, Chile, Bolivia y Argentina, sin embargo, domesticada al sur de Ecuador y el norte de Perú, por ende, se cultiva en toda la sierra ecuatoriana con un crecimiento de demanda desde hace 15 años (Venancio y col., 2010).

4.1.2. Descripción botánica

El tomate de árbol tiene una raíz superficial “adventicia”, de hasta 1 m, a los 25 cm de profundidad se encuentran las raíces absorbentes secundarias con mayor intensidad (INIAP, 2004). El tallo tiene forma cilíndrica, conforme se desarrolla se torna leñoso, y se divide en tres ramas a la altura de 1-1.50 m; sus hojas son perennes, alternas, simples, enteras, de forma ovada y ápice agudo, su pubescencia es moderada en el haz y densa al envés, el limbo de las hojas del tallo principal mide de 25-40 cm de longitud, 20-30cm de ancho, mientras que de la copa miden entre 7-20 cm de longitud y 6-15 cm de ancho, la coloración del follaje es verde; las flores son hermafroditas, actinomorfas de forma estrellada y pentámera, sus botones florales tienen forma elipsoidal u ovoide, su cáliz es sinsépalo, la corola es simpétala de color rosáceo, posee cinco estambres y su ovario en conjunto con el estilo son glabros; los frutos son bayas de forma ovoide, el tamaño oscila



entre los 4-10 cm de largo y 3-5 cm de ancho, el exocarpo es liso de color amarillo, anaranjado, rojo o morado de acuerdo al genotipo, y posee franjas longitudinales oscuras; la pulpa o mesocarpo es jugosa semi ácida – dulce; y las semillas son dicotiledóneas, pequeñas, aplanadas, de color blanco, en periodo de formación y conforme alcance su maduración es recubierta por mucilago del propio fruto (Acosta, 2011).

4.1.3. Tomate de árbol en Ecuador

Ecuador hasta el año 2018 exportó, 20 mil kg de tomate de árbol con destino hacia España Holanda, Bélgica, Francia, Italia, Suiza y Alemania. Para el 2019 Ecuador cumple con los requisitos para exportar a 33 países alrededor del mundo, sin embargo, entre todos estos países esta EEUU con una exportación de 600 kg de fruta fresca certificada por agro calidad (Agrocalidad, 2019). Sin embargo, las condiciones edafoclimáticas permiten el desarrollo de enfermedades que a su vez disminuyen la producción en calidad del fruto (INIAP, 2014).

No obstante los estudios realizados en tomate de árbol en el Ecuador cada día toma más énfasis tal es el caso en los estudios realizados por (León y Tamba, 2014), en las provincias de Pichincha (Tumbaco) y Tungurahua (Pelileo), en este caso se evaluaron 5 grupos de segregantes y clones provenientes de una cruce de [(*S. unilobum* x *S. betaceum*) x *S. betaceum*] x *S. betaceum* anaranjado en la resistencia contra antracnosis, obteniendo 6 plantas segregantes y 3 clonales resistentes a las antracnosis distribuidas en el sector de Pelileo y Tumbaco.

De la misma manera estudios realizados por Narváez y Francisco (2012) desterrminaron que al utilizar segregantes provenientes del cruce de plantas silvestres emparentadas [*S. unilobum* x *S. betaceum*) x *S. betaceum*], al exponerlas a una infección inducida por la enfermedad, todas las plantas presentaron la enfermedad con una



incidencia del 27.9 % y de severidad del 26.44%. No obstante, al utilizar segregantes sin inducir la enfermedad obtuvieron 11 plantas sin contaminación con antracnosis en el sector de Tumbaco.

4.2. Antracnosis

La antracnosis conocida comúnmente como “Ojo de pollo”, es una de las enfermedades de mayor importancia en el Ecuador, al no disponerse de un control eficiente para la misma. Todos los eco tipos de *Solanum betaceum* cultivadas comercialmente son susceptibles a la presencia y ataque del patógeno. Siendo mayor su incidencia en épocas de lluvias frecuentes con temperaturas de 13 a 15 °C y con una humedad ambiental del 95 % (Alarcón, 2012).

Los síntomas que se presenta en los frutos son: lesiones iniciales negras, que pueden llegar a cubrir todo el fruto, posteriormente se tornan de color pardo o negro, con bordes definidos y ligeramente hundidos. En el centro de la lesión se forma un polvillo de color rosado o salmón competente a la esporulación del hongo, quedando el fruto completamente cubierto y seco (Saldarriaga y col., 2008).

Colletotrichum sp. fue reportado por primera vez por Tode en 1790 como el género *Vermicularia*; sin embargo, Corda (1831) lo denominó con su nombre actual (Sharma y Shenoy, 2016). Cannon y col (2012), indican que el género *Colletotrichum* comprende nueve clados principales (*tamarilloi*, *graminicola*, *spaethianum*, *destructivum*, *dematium*, *gloeosporioides*, *bobínense*, *truncatum*, *orbiculare*), una serie de pequeños racimos y 9 especies aisladas.

4.3. Caracterización molecular por multilocus

La caracterización por análisis multilocus es un método utilizado para la obtención de las relaciones filogenéticas de especies dentro de un género, familia o especie, en el



cual se utilizan secuencias parciales de genes para codificar proteínas con funciones conservadas y generar árboles filogenéticos y deducir las filogenias (Glaeser y Kämpfer, 2015). Sin embargo, el análisis filogenético molecular multilocus está basado en secuencias combinadas de actina (ACT), β -tubulina (TUB2) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Caicedo y col., 2017)

El gen de la actina es primordial debido a que los organismos eucariotas en el transporte de vesículas, orgánulos e incluso cromosomas utiliza micro túbulos de actina que componen el cito esqueleto en la agrupación y estabilización mecánica de las células, de esta manera los cables de actina desempeñan un papel esencial para el desarrollo de la penetración del patógeno (Shaw, 2016).

La β -tubulina es componente del cito esqueleto constituidas por dos proteínas globulares (alfa (α) tubulina y beta (β) tubulina), que son primordiales para el reconocimiento de grupos inter específicos, entre ellas *C.acutatum*, basándose en las secuencias de ADNr (ITS) y en ADN (TUB2) (Rodriguez y col., 2007).

El gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de función metabólica en el proceso de glucolisis, sintetiza el ADN, regula la transcripción, participa en la apoptosis, exportación de ARNt y ARNm, estabilización de ARNm, desplegamiento de ARN y regulación traduccional (Guerber y col., 2003).

4.4. Resistencia Sistémica Adquirida (RSA)

La Resistencia Sistémica Adquirida es un tipo de resistencia inducida que protege a la planta de una infección dada por patógenos en dos fases: primero reconoce al patógeno e induce las respuestas locales de defensa, el cual conlleva a la segunda fase de la resistencia en el tejido sistémico distante del tejido infectado (Puentes, 2012).



Dentro de la RSA se ha señalado al AS como la vía de la señalización para que se produzcan las reacciones de defensa en las plantas, ya que forma una amplia cantidad de compuestos sintetizados denominados fenólicos, el cual en su estructura posee un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático, el cual le da las propiedades de inducir la resistencia en las plantas (Sánchez y col., 2010).

Con la aplicación del AS por primera vez en las plantas de tabaco a nivel foliar por White en 1979 como participación en la resistencia relacionada a la patogénesis, se obtuvo la formación de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) que otorgan la resistencia a virus del mosaico del tabaco, en un 90% de efectividad (Sánchez y col., 2010).

Las proteínas R que intervienen en la síntesis del AS son del tipo CC-NBS-LRR o TIR-NBS-LRR. Estas reacciones conllevan a la acumulación del AS en las zonas estructurales de la planta (Díaz, 2012). Adicionalmente en estudios complementarios por Liu y col (2010) usando el gen Rx de la papa, que confiere resistencia al Virus de la Papa X en ausencia de muerte celular, demostraron que la respuesta hipersensible es prescindible para la inducción de RSA mediada por la proteína R y que la RSA inducida por el gen Rx está mediado por el mismo salicilato vía dependiente inducida por otras proteínas R.

Además, el AS se lo ha venido estudiando desde varios años atrás tal es el caso en el estudio realizado por Métraux y colaboradores (1990) que determinaron que podría funcionar como la señal endógena en la transmisión de RSA en el pepino ante la enfermedad de *Colletotrichum lagenarium*. Al igual en estudios realizados por Naylor y colaboradores (1998) afirmaron que el AS a más de inducir el RSA es de utilidad para obtener mejores respuestas ante los virus en el movimiento vegetal. Además ante la presencia fúngica en el fruto de plátano el aplicar AS demostró que inhibe el crecimiento



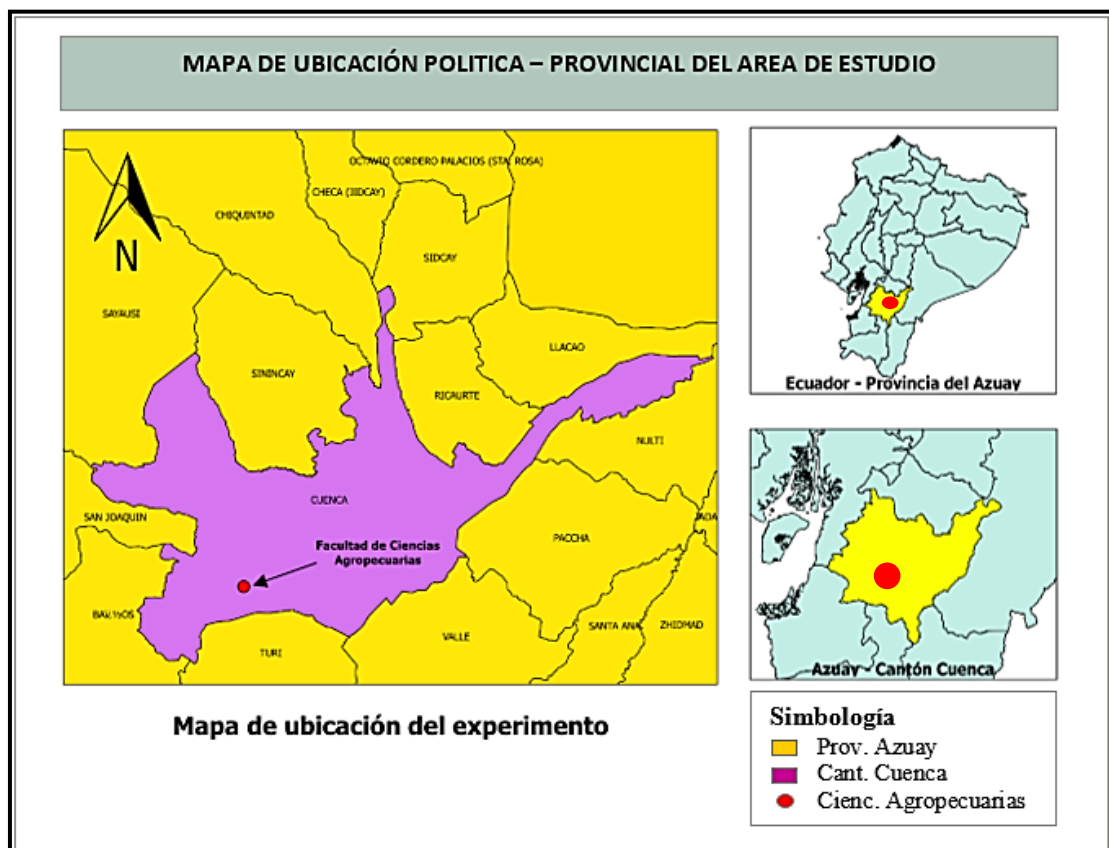
micelial de *Colletotrichum sp* a nivel en vitro (Varela y col., 2015). Y en estudios realizados por Silva y colaboradores (2018) en el cultivo de frijol caupí, determinaron que la aplicación de AS con una concentración de 10.0 mg mL⁻¹, mediante rociamiento directamente en toda la planta con antracnosis causada por *Colletotrichum lindemuthianum* disminuyó la escala de severidad de antracnosis en el cultivo.

Cabe recalcar que la importancia de la RSA ejemplifica que las rutas metabólicas relacionadas con los aminoácidos cumplen tareas integrales en el sistema inmune de la planta. En el tejido sistémico no infectado, la respuesta metabólica es más específica y se asocia con niveles mejorados (Stahl y col., 2016). Tal es el caso en el estudio realizado por Diaz y col (2016) quienes al aplicar AS en el cultivo de *Solanum lycopersicum* en diferentes concentraciones desde 0.1, 0.2, y 0.4 mM, mostraron diferencias significativas en la producción y calidad del fruto.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

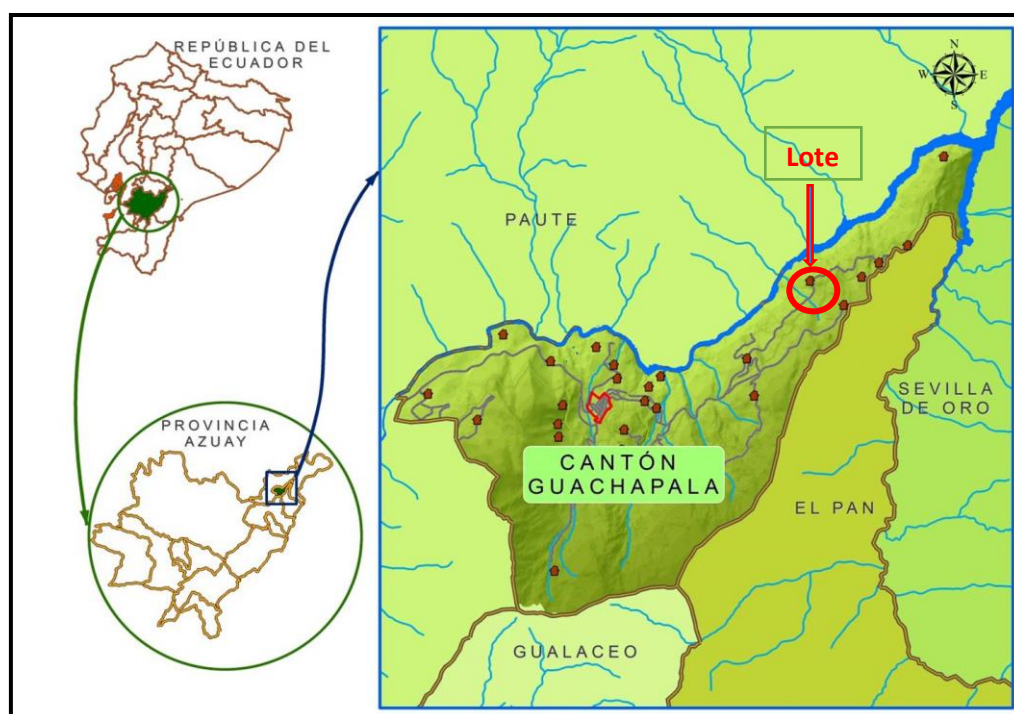
5.1. Área de estudio

El presente trabajo investigativo se llevó a cabo en el laboratorio de biología molecular que cuenta la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Cuenca, campus Yanuncay, ubicada en el sector de Yanuncay, con una altura de 2567 m.s.n.m, cuyas coordenadas UTM son $2^{\circ}55'12.6''S$ $79^{\circ}01'30.6''W$, y que a su vez disponía de los equipos y espacios para la ejecución de la investigación (Figura 1). En cuanto a la investigación en campo se llevó a cabo en la propiedad del señor Luis Caracondo, ubicada en el sector de Sacre perteneciente al cantón Guachapala de la provincia del Azuay, cuyas coordenadas UTM son $2^{\circ}45'05.0''S$ $78^{\circ}40'34.1''W$ (Figura 2), que disponía de un cultivo en producción ya establecido (2 años).



Fuente: IGM

Figura 1. Mapa de ubicación de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.



Fuente: SIGTIERRAS

Figura 2. Mapa de ubicación del lote del cultivo de tomate de árbol.

5.2. Materiales

Tabla 1. Materiales usados en el desarrollo de la investigación.

Biológicos	Físicos	Laboratorio
Plantas de <i>Solanum betaceum</i> con antracnosis, ADN de <i>Collectotrichum</i> sp.	Libreta de campo, etiquetas de identificación, cámara fotográfica.	Puntas para micro pipetas, tubos de micro centrifuga de 1.5 ml, guantes, mascarilla, servilletas estériles.
Equipos	Reactivos	Programas
Incubadora, refrigeradora, balanza de precisión, autoclave, centrifugadora, cámara de electroforesis, micro pipetas, agitador vortex,	Alcohol al 70%, agua destilada, agarosa, primers, TAE 1X, bromuro de etidio, ácido salicílico.	Software Excel, Word, Infostat.



5.3. Métodos

5.3.1. Metodología para la investigación experimental del objetivo 1

- Evaluar tres concentraciones de ácido salicílico como inductor de la resistencia sistémica adquirida contra la antracnosis.

Se utilizó ácido salicílico (AS) en soluto diluido. Se aplicó mediante rociamiento una vez por semana por vía foliar y en frutos en tres concentraciones en el cultivo de tomate de árbol: 0.1, 0.2, y 0.4 mM (Díaz y col., 2016) (Tabla 2). Es necesario recalcar que durante el período de aplicación de los tratamientos no se realizó aplicaciones de productos químicos para el control de plagas o enfermedades.

Tabla 2. Concentración de ácido salicílico usado por tratamiento.

Código	Tratamiento	Concentración (mM)
1	Ácido salicílico	0.4
2	Ácido salicílico	0.2
3	Ácido salicílico	0.1
4	Testigo	Sin aplicación

Para verificar el efecto del AS en el control de antracnosis se tomó en cuenta dos parámetros: la **Incidencia** y la **Severidad**.

La **incidencia** o número de casos con la enfermedad: para calcularlo en cada planta por tratamiento, se contabilizó las hojas y los frutos que presentaban la enfermedad, como también el total de los mismos después de la aplicación del AS. Y se aplicó la fórmula propuesta por Anculle, y Álvarez (1999), para conocer la incidencia de antracnosis en hojas y frutos como se muestra en la ecuación 1.

Ecuación 1. Incidencia de la enfermedad.

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Número de hojas o frutos infectados}}{\text{Total de hojas o frutos}} \times 100$$

La **severidad** o porcentaje del tejido vegetal contaminado. Para su respectiva evaluación en campo se utilizó la tabla 3 propuesto por (Botero, 2001), y después teniendo en cuenta el grado de afección calificada de tejido contaminado en hojas como en frutos se lo valoró por medio de la fórmula propuesta por Anculle, y Álvarez (1999), ecuación 2.

Tabla 3. Escala de severidad en antracnosis.

Cobertura por la enfermedad	Grado de Severidad	Clasificación
1-3%	1	Tolerante
3-5%	2	Tolerante
5-7%	3	Tolerante
7-10%	4	Tolerante
10-17%	5	Tolerante
17-20%	6	Medianamente tolerante
20-30%	7	Medianamente susceptible
30-40%	8	Susceptible
50 o más %	9	Muy susceptible

Fuente: (Botero, 2001)

Ecuación 2. Severidad de la enfermedad

$$\text{Severidad} = \frac{\text{Número de hojas o frutos en cada grado}}{\text{Total de hojas o frutos}} \times 100$$

Desprendimiento de hojas y frutos, para calcularlo en cada planta por tratamiento se lo contabilizó por medio de la diferencia de hojas y frutos con antracnosis del total de la toma de datos recolectados anteriormente de la planta.

La toma de datos fue realizada cada 8 días después de la primera aplicación con AS en el cultivo.




5.3.1.1. *Diseño experimental*

Para evaluar las tres concentraciones de AS, se utilizó un diseño de bloques completamente al azar, ya que permite realizar comparaciones precisas entre los tratamientos del estudio, además de reducir y controlar la varianza del error experimental permitiendo una mayor precisión. Se utilizaron tres dosis, un testigo y 10 repeticiones como se representa en el diagrama 1. En un total de 40 plantas en un estado fenológico de fructificación y con presencia de antracnosis con grado 9. Los datos de las variables evaluadas presentaron valores lejanos o iguales a cero, por lo tanto fueron transformados mediante la fórmula $\sqrt{x} + 1$ de tipo lineal (Sabadías, 1995).

Para los datos de las variables, severidad en hojas, incidencia en frutos, incidencia en hojas, severidad en frutos, desprendimiento de frutos y desprendimiento de hojas, se realizó un análisis de distribución normal (test de Shapiro-Wilk modificado), de esta manera para las variables que presentaron una distribución normal como: severidad en hojas e incidencia en frutos, se ejecutó un análisis de varianza con prueba de Duncan al 5%. Para las variables que no presentaron una distribución normal con los datos transformados como: incidencia en hojas, severidad en frutos, desprendimiento de frutos y desprendimiento de hojas, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis utilizando los datos originales no transformados con el propósito de evaluar la existencia de diferencias entre los tratamientos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el software Infostat versión 2019e.

Diagrama 1. Representación de la ubicación de cada tratamiento y testigo a evaluar.

Bloque 1		Bloque 2	
 T1	 T3	 T1	 T3
 T2	 C	 T2	 C
Bloque 3		Bloque 4	
 T3	 T1	 T3	 T1
 C	 T2	 C	 T2
Bloque 5		Bloque 6	
 T1	 T3	 T1	 T3
 T2	 C	 T2	 C
Bloque 7		Bloque 8	
 T3	 T1	 T3	 T1
 C	 T2	 C	 T2
Bloque 9		Bloque 10	
 T1	 T3	 T1	 T3
 T2	 C	 T2	 C

- T1= tratamiento 1 con 0.4 mM/L
 - T2= tratamiento 2 con 0.2 mM/L
 - T3= tratamiento 3 con 0.1 mM/L
 - C= testigo en 10 plantas
- Total, de plantas= 40
Cada bloque con una planta por tratamiento.

5.3.2. Metodología para la investigación experimental del objetivo 2

- Caracterizar molecularmente el género *Colletotrichum* mediante análisis multilocus por PCR para identificar la especie responsable de la antracnosis.

5.3.2.1. Toma de ADN de antracnosis

Se utilizó 16 muestras de ADN de *Colletotrichum sp* provenientes de las provincias de Azuay y Loja, los mismos que se hallaban disponibles en el Laboratorio de

Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, usados en los estudios realizados por Castro y col., (2019).

5.3.2.2. Caracterización molecular

Con las muestras de ADN disponibles para la caracterización molecular se utilizó 3 pares de primers para determinar la especie responsable de la enfermedad de antracnosis, mediante la aplicación de una PCR. La PCR se realizó con primers específicos que se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Primers específicos para la determinación de la especie de Collectotrichum sp.

Gen	Primers	Temperatura (°C)	Secuencia 5'- 3'
(ACT)	ACT 512-F	58	ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC
	ACT 783-R	58	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT
(TUB2)	T1-F	55	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT
	T2-R	55	TAG TGA CCC TTG GCC CAG TTG
GAPDH	GDF	58	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA
	GDR	58	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT

Las reacciones de PCR tuvieron un volumen final de 25 µl, que estuvo compuesta de 13.25 µl de H₂O estéril, 2.5 µl de Buffer 10X, 0.75 µl de MgCl₂ (50 mM), 0.5 µl de cada uno de los dNTPs (2.5 mM), 2.5 µl de cada primer (100 µM), 0.5 µl de ADN polimerasa (Invitrogen) y 1 µl de ADN a una concentración de (50 ng/µl).

Las condiciones de PCR se realizaron en el termociclador Eppendorf Mastercycler NexusGSX1 y estuvo compuesta de una desnaturalización inicial de 94 °C durante 3 minutos, seguida de una desnaturalización de 94 °C durante 30 segundos, una temperatura de hibridación de 58 y 55 °C durante 30 segundos, una temperatura de extensión de 72 °C durante 45 segundos, estos 3 últimos pasos se programó para una repetición de 35 ciclos, para concluir con una temperatura de extensión final de 72 °C durante 4 minutos.



Los productos de PCR fueron visualizados en un gel elaborado de agarosa al 0.5 % en buffer TAE1X, aplicado en una electroforesis durante un tiempo de 40 min seguido de una tinción en bromuro de etidio por 40 min (Lalangui, 2015).



6. RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos a la inducción de la resistencia con la aplicación del AS en diferentes concentraciones de las variables incidencia y severidad de la antracnosis en frutos y hojas de tomate de árbol, durante un periodo de 3 meses de manera global. También se presentan los resultados del análisis molecular por multilocus de la especie responsable de la antracnosis.

6.1. Efecto del ácido salicílico en la inducción de la resistencia frente a la antracnosis

Los datos recolectados por variable fueron sometidos a una prueba de normalidad (Shapiro-Wilk modificado) tabla 5, por tal motivo para las variables severidad en hojas, e incidencia en frutos, se realizó la prueba de ANOVA con Duncan al obtener una distribución normal. Para las variables incidencia en hojas, severidad en frutos, desprendimiento de frutos y desprendimiento de hojas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Tabla 5. Pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk modificado) para cada variable.

Variable	Shapiro-Wilks	p-valor
Severidad en Hojas	0.92	0.1825
Incidencia en Frutos	0.92	0.1270
Incidencia en Hojas	0.86	0.0010
Severidad en Frutos	0.63	<0.0001
Desprendimiento de Hojas	0.75	<0.0001
Desprendimiento de Frutos	0.52	<0.0001

6.1.1. Severidad en hojas

La severidad de la antracnosis en hojas en la tabla 6 y 7, presentó una diferencia significativa entre tratamientos en el que las concentraciones 0.1 mM, 0.4 mM y 0.2 mM presentaron el valor más significativo con respecto al testigo ($P < 0.0001$).

Tabla 6. Análisis de varianza de la severidad de antracnosis en hojas.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Modelo	43	12	3.58	4.07	0.0012
Tratamientos	31.48	3	10.49	11.91	<0.0001
Bloques	11.53	9	1.28	1.45	0.2151
Error	23.78	27	0.88		
Total	66.78	39			

Tabla 7. Comparación de medias con Duncan de la severidad de antracnosis en hojas.

Tratamientos	Medias	
0.1 mM	7.40	A
0.4 mM	7.60	A
0.2 mM	7.70	A
Testigo	9.60	B

Los resultados de menor severidad que se presentaron después de la aplicación de AS, indicaron una variación en los grados de afección de acuerdo a las diferentes concentraciones que se colocó a cada planta. En la figura 3 se muestra que las concentraciones de 0.1 mM, 0.4 mM y 0.2 mM, las hojas obtuvieron un menor grado de afección frente al testigo. La concentración 0.1 mM obtuvo un valor de grado 6 lo que equivale a un porcentaje de severidad del 20 %, con una clasificación medianamente tolerante. Las concentraciones 0.4 mM y 0.2 mM obtuvieron un valor de grado 7 con el 30 % de severidad de clasificación medianamente susceptible. Y el testigo con un valor de grado 9 con un 70% de severidad mostrándose como muy susceptible.

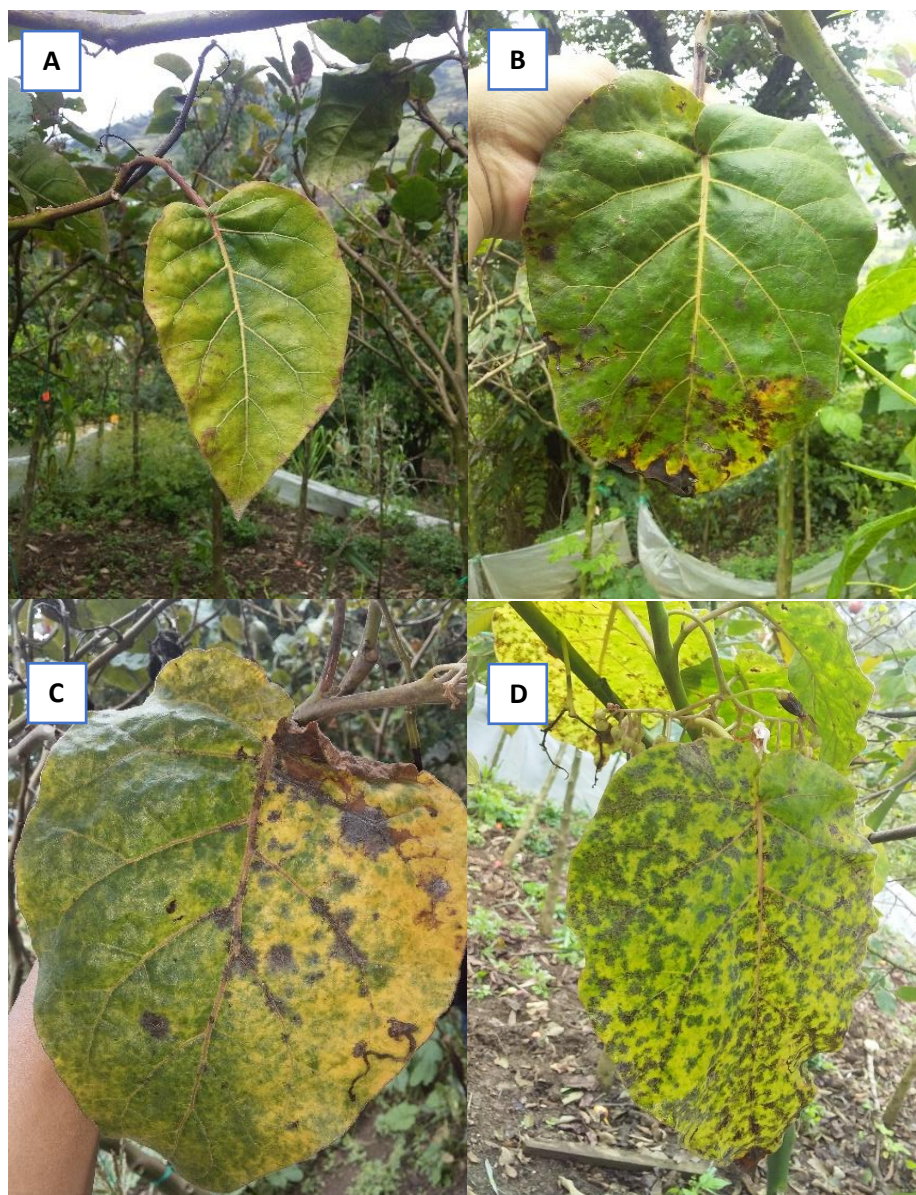


Figura 3. Efecto del AS por cada tratamiento con una concentración de 0.1 mM (A), 0.4 mM (B), 0.2 mM (C) y Testigo (D).

6.1.2. Incidencia en Frutos

No se presentó ninguna diferencia significativa entre tratamientos en ninguna semana ya que $p > 0.05$ (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de varianza de la incidencia de antracnosis en frutos.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Modelo	33.72	12	2.81	1.66	0.133
Tratamientos	2.2	3	0.73	0.43	0.7307
Bloques	31.52	9	3.5	2.07	0.0696
Error	45.68	27	1.69		
Total	79.4	39			

6.1.3. Incidencia en hojas

En las tablas 9 y 10 se presenta la incidencia de hojas con una diferencia significativa entre los tratamientos ($P = 0.0157$). De acuerdo a la prueba de los rangos múltiples de Kruskal Wallis los tratamientos 0.1 mM, 0.2 mM y 0.4 mM presentaron una diferencia estadística con respecto al testigo y con un valor del 11 % del número de hojas con antracnosis.

Tabla 9. Prueba de Kruskal Wallis en la incidencia de antracnosis en hojas.

Tratamientos	Número de muestras	Medias	Desviación estándar	Medianas	Test H	p-valor
0.1 mM	10	18	7.12	15	10.31	0.0157
0.2 mM	10	19.7	4.03	20		
0.4 mM	10	20.9	6.45	22.5		
Testigo	10	43.5	23.68	40		

Tabla 10. Comparación de a pares con Kruskal Wallis en la incidencia de antracnosis en hojas.

Tratamientos	Rangos
0.1 mM	14.15 A
0.2 mM	17.85 A
0.4 mM	19.85 A
Testigo	30.15 B



6.1.4. Severidad en frutos

En la tabla 11 y 12 se presentan los resultados de la severidad en frutos, encontrándose una diferencia significativa entre tratamientos ($P = 0.0230$). De acuerdo a la prueba de los rangos múltiples de Kruskal Wallis los tratamientos 0.2 mM y 0.4 mM difieren estadísticamente del testigo.

Tabla 11. Prueba de Kruskal Wallis en la severidad en frutos.

Tratamientos	Número de muestras	Medias	Desviación estándar	Medianas	Test H	p-valor
0.4 mM	10	58	33.60	70	9.08	0.0230
0.2 mM	10	51	40.12	60		
0.1 mM	10	84	30.26	90		
Testigo	10	85	31	100		

Tabla 12. Comparación de a pares con Kruskal Wallis en la severidad en frutos.

Tratamientos	Rangos	
0.2 mM	14.65	A
0.4 mM	15.25	AB
0.1 mM	25.45	BC
Testigo	26.65	C

Los resultados de menor severidad que se presentaron después de la aplicación de AS, indicaron una variación en los grados de afección de acuerdo a las diferentes concentraciones que se colocó a cada planta. En la ilustración 4 se muestra como las concentraciones de 0.2 mM, 0.4 mM y 0.1 mM difieren en un menor grado de contaminación frente al testigo. En el que las concentraciones 0.2 mM, 0.4 mM obtuvieron un valor de grado 7 lo que equivale a un porcentaje de severidad del 30 %, con una clasificación medianamente susceptible. La concentración 0.1 mM obtuvo un valor de grado 8 lo que equivale a un 40 % de severidad de clasificación susceptible. Y el testigo con un valor de grado 9 con un 90% de severidad mostrándose como muy susceptible.

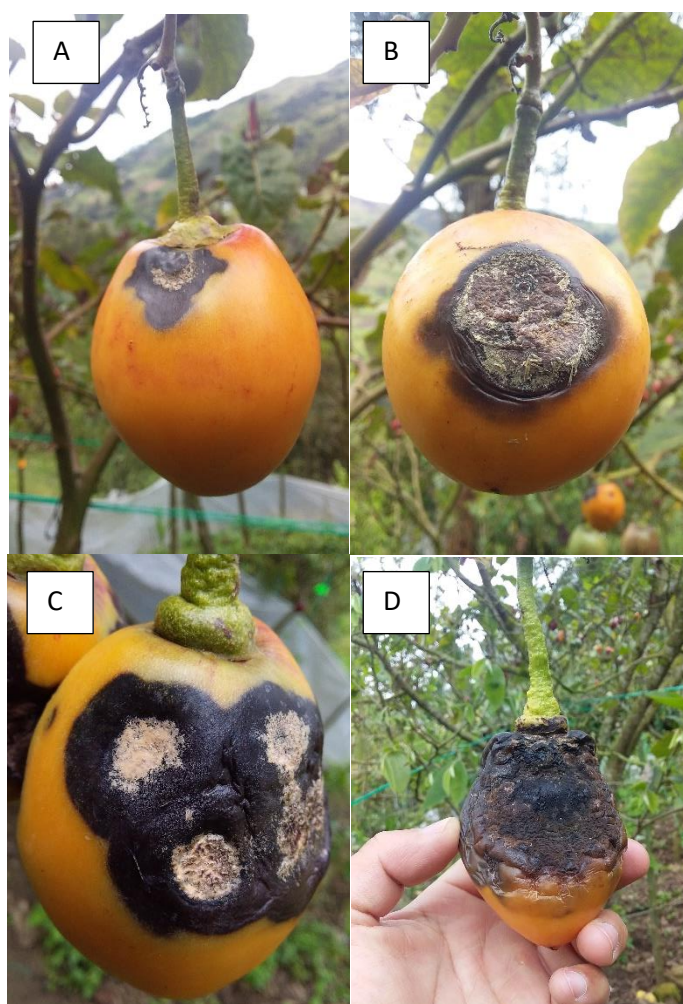


Figura 4. Efecto del AS por cada tratamiento con una concentración de 0.2 mM (A), 0.4 mM (B), 0.1 mM (C) y Testigo (D).

En la figura 5, se muestra el porcentaje de la severidad en los frutos con antracnosis de acuerdo a su diámetro de tejido contaminado, este porcentaje se obtuvo de las plantas testigo.

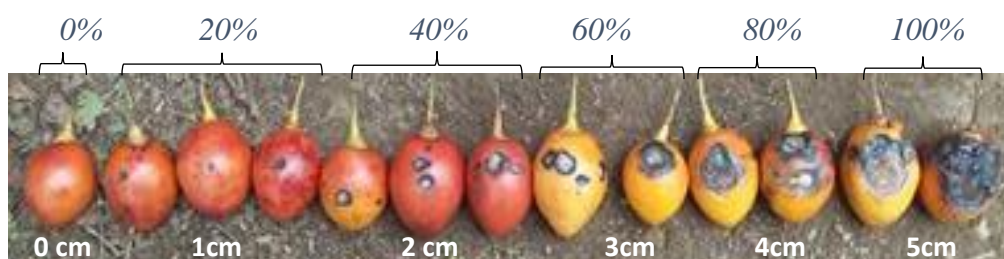


Figura 5. Escala de severidad en frutos de acuerdo al diámetro del tejido contaminado.

6.1.5. Desprendimiento de hojas con antracnosis.

También se evaluó la variable desprendimiento de hojas con antracnosis. En la tabla 13 y 14 se encontró una diferencia significancia entre los tratamientos ($P = 0.0108$). De acuerdo a la prueba de los rangos múltiples de Kruskal Wallis el tratamiento 0.4 mM presentó la mayor cantidad de desprendimiento de las hojas con relación al testigo (Tabla 13 y 14).

Tabla 13. Prueba de Kruskal Wallis en desprendimiento de hojas con antracnosis.

Tratamientos	Número de muestras	Medias	Desviación estándar	Medianas	Test H	p-valor
0.4 mM	10	4.2	3.12	4.5	9.88	0.0108
0.2 mM	10	1	1.25	1		
0.1 mM	10	1.6	2.46	1		
Testigo	10	0.7	2.21	0		

Tabla 14. Comparación de a pares con Kruskal Wallis en desprendimiento de hojas con antracnosis.

Tratamiento	Rango	
Testigo	12.65	A
0.2 mM	19.5	A B
0.1 mM	20.85	A B
0.4 mM	29	B

6.1.6. Desprendimiento de frutos con antracnosis.

También se evaluó la variable desprendimiento de frutos con antracnosis. Se encontró diferencia estadística entre tratamientos ($P = 0.0183$). De acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Kruskal Wallis presentó una diferencia significativa entre el tratamiento 0.4 mM con relación al testigo (Tabla 15 y 16).

Tabla 15. Prueba de Kruskal Wallis en desprendimiento de frutos con antracnosis.

Tratamientos	Número de muestras	Medias	Desviación estándar	Medianas	Test H	p-valor
0.4 mM	10	3.60	4.88	1.50	4.89	0.0183
0.2 mM	10	0.20	0.42	0		
0.1 mM	10	0.10	0.32	0		
Testigo	10	0	0	0		

Tabla 16. Comparación de a pares con Kruskal Wallis en el desprendimiento de frutos con antracnosis.

Tratamientos	Rangos	
Testigo	16.5	A
0.1 mM	18.25	A B
0.2 mM	20	A B
0.4 mM	27.25	B

En la tabla 17, se muestra la temperatura ambiental de tres meses del cantón Guachapala, cuyas temperaturas abarcan el lote donde se ejecutó esta investigación.

Tabla 17. Temperatura ambiental del Canto de Guachapala

Semana	Temperatura (°C)	Precipitación (mm)	HR (%)	Viento (m/s)
1	25	0	80	8,6
2	22	0	77	9
3	25	0	80	9,2
4	25	0	80	9,8
5	26	0	81	9,8
6	25	0	80	10
7	24	0	79	10,5
8	22	0	77	11
9	23	0	78	11,6
10	25	0	80	10,8
11	26	4,1	81	12
12	26	0	80	11,5

Fuente: Estación meteorológica de la granja el Romeral de la Universidad de Cuenca

6.2. Caracterización molecular de la especie responsable de la antracnosis por multilocus

El análisis multilocus se realizó con 3 pares de primers, definidos para los genes ACT, TUB2 y GAPDH (Tabla 7). Todos los primers utilizados, mostraron amplificación para antracnosis perteneciente al complejo *C. acutatum*, amplificando bandas visibles para esta enfermedad y no se presentaron amplificaciones en muestras de control negativo sin (ADN).

6.2.1. Amplificación molecular con ACT (F y R)

Para la pareja de primers utilizadas en la PCR correspondientes para actina (**ACT 512-F**: ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC) y (**ACT 783-R**: TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT) en la figura 6, se muestra un total de 4 bandas de ADN amplificadas con un peso molecular de 300 pb en un gel de agarosa al 5% al ser teñidas con bromuro de etidio. Las bandas ubicadas en las columnas con codificación (2.1, 2.3 y 4.1) corresponden a la provincia del Azuay y la codificación (7.2) pertenece a la provincia de Loja.

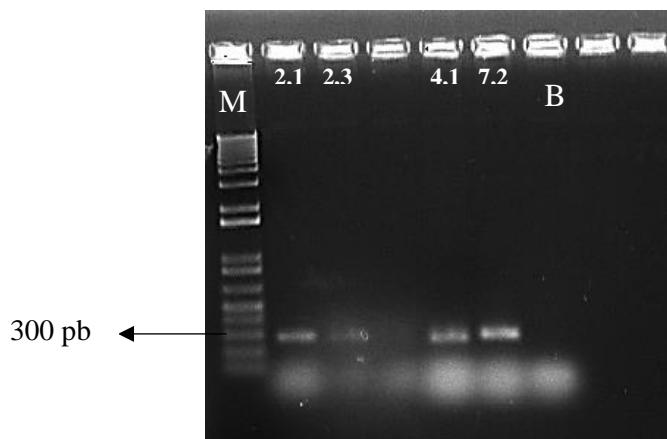


Figura 6. Amplificación de 4 muestras de ADN con primers de actina. **M**: peso molecular, **B**: control, Muestras de Azuay (2.1, 2.3 y 4.1), Muestras de Loja (7.2); Gel de agarosa al 0.5 % en buffer TAEIX, y tinción con bromuro de etidio.

6.2.3. Amplificación molecular con TUB2 (F y R)

Para la pareja de primers correspondientes para β -tubulina (**T1-F**: AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT) y (**T2-R**: TAG TGA CCC TTG GCC CAG TTG) utilizadas en la PCR, en la figura 7, se visualiza una amplificación de 4 bandas de ADN con un peso molecular de 700 pb en un gel de agarosa al 5% al ser teñidas con bromuro de etidio. Las bandas ubicadas en las columnas con codificación (2.5, y 4.1) corresponden a la provincia del Azuay y la codificación (7.2 y 9.2) pertenece a la provincia de Loja.

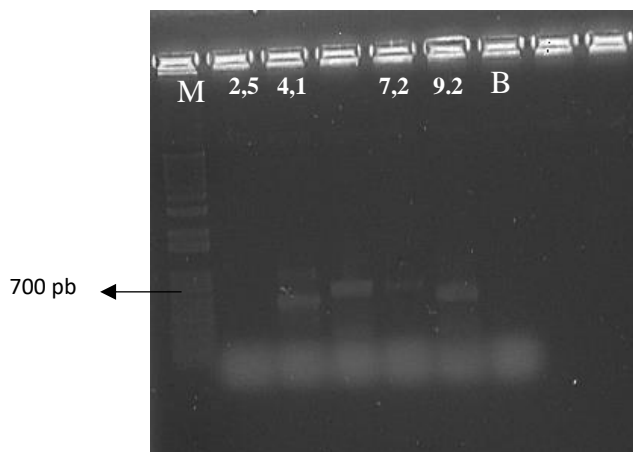
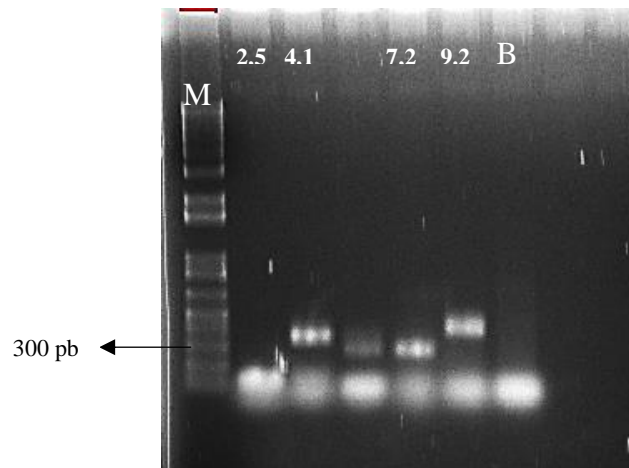


Figura 7. Amplificación de 4 muestras de ADN con primers de β -tubulina. M: peso molecular, B: control, Muestras de Azuay (2.5 y 4.1), Muestras de Loja (7.2 y 9.2); Gel de agarosa al 0.5 % en buffer TAEIX, y tinción con bromuro de etidio.

6.2.4. Amplificación molecular con GAPDH (F y R)

Para la pareja de primers correspondientes para Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (**GDF**: GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA) y (**GDR**: GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT) aplicado en la PCR, en la figura 8, se visualiza una amplificación de 4 bandas de ADN con un peso molecular de 300 pb en gel de agarosa al 5% al ser teñidas con bromuro de etidio. Las bandas ubicadas en las columnas con codificación (2.5, y 4.1) corresponden a la provincia del Azuay y la codificación (7.2 y 9.2) pertenece a la provincia de Loja.



*Figura 8. Amplificación de 4 muestras de ADN con primers de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. **M**: peso molecular, **B**: control, Muestras de Azuay (2.5 y 4.1), Muestras de Loja (7.2 y 9.2); Gel de agarosa al 0.5 % en buffer TAE1X, y tinción con bromuro de etidio.*



7. DISCUSIÓN

Esta investigación fue llevada a cabo con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de AS, como desencadenante de la Resistencia Sistémica Adquirida en el cultivo de *Solanum betaceum* frente a la antracnosis. También se caracterizó molecularmente el patógeno responsable de esta enfermedad en las provincias de Azuay y Loja.

Para la evaluación, se tomó en consideración tres diferentes concentraciones frente a un testigo para las variables severidad en hojas, incidencia en frutos, incidencia en hojas, severidad en frutos, desprendimiento de hojas y desprendimiento de frutos, aplicadas de forma directa a nivel foliar y en frutos. Se observaron diferencias significativas en las diferentes variables.

Para la variable severidad en hojas la concentración 0.1 mM presentó los menores valores (severidad del 20%) ante la enfermedad con una temperatura ambiente promedio de 25°C. Sin embargo al comparar con lo obtenido por Mena y Pesántez (2009) en su investigación, ellos contrarrestaron la severidad de la antracnosis utilizando un compuesto químico “Polimaxin”, con un porcentaje de 3% y 5% en temperaturas ambientales promedio de 14 °C.

Para la incidencia en frutos no se encontraron resultados favorables en esta investigación, sin embargo cabe mencionar que la utilización del AS ha tomado énfasis en el control contra la antracnosis en los frutos, tal es el caso en los estudios realizados por Santamaría y col (2011) quienes mencionan que al utilizar AS en combinación con un compuesto químico “Prochloraz”, obtuvieron un incremento en la tolerancia y reducción de la incidencia de antracnosis en un 100% de efectividad en el fruto de papaya. En cambio investigaciones por Varela y col (2015) determinan que al aplicar



concentraciones de 2 mM de hasta 5 mM de AS en la fruta del plátano no se encontró ninguna presencia de antracnosis, y únicamente hubo un 40% de necrosis en la corona.

Para la incidencia de la enfermedad en hojas, se observó que las concentraciones 0.1 mM, 0.2 mM y 0.4 mM, presentaron un 11 % del número de hojas con antracnosis a una temperatura ambiente promedio de 25°C, lo cual se asemeja con las investigaciones realizadas por Contreras y col (2017) para el control de antracnosis en *Solanum tuberosum*. En este estudio se indica que la aplicación de AS en concentraciones de 0.2 mM y 0.4 mM, con temperaturas ambientales de 15 a 21 °C, permitió obtener un mejor resultado para el vigor de la planta, reduciendo la incidencia de antracnosis y por ende consideraron que las dosis utilizadas son relativamente bajas para este control y de tal manera no afectan a *Solanum tuberosum* en cuanto a la producción. En cambio, de acuerdo al resultado obtenido en esta investigación al compararlo con la efectividad de un compuesto químico, no se distancia de la incidencia porcentual de los estudios realizados por Mena y Pesántez (2009) ante el control de antracnosis en las hojas, mediante el control químico con “Polimaxin” quienes obtuvieron buenos resultados con una incidencia del 1% de la enfermedad en el cultivo de *Solanum betaceum*. Sin embargo, Barbora y col (2015), argumentan que el uso de ingredientes activos en cantidades excesivas en *Colletotrichum* provoca la resistencia a los ingredientes activos, por tal motivo al no impedir el desarrollo de esta enfermedad la hace más resistente y perjudicial para el cultivo por lo que se ve la necesidad de buscar nuevos ingredientes activos más fuertes e incluso más perjudiciales que pueden llegar afectar la salud misma de los seres humanos.

En cuanto a severidad en frutos la concentración 0.2 mM a una temperatura ambiente promedio de 25 °C tuvo un menor impacto de la enfermedad ante los demás tratamientos. Sin embargo como alternativa de control en los estudios realizados por



Zainuri y col (2001) menciona que la aplicación de AS con una concentración de 2 000 mg/ L a una temperatura ambiental de 23 °C redujo la severidad de antracnosis en poscosecha, en el fruto del cultivo de mango.

Para la variable desprendimiento de las hojas, la concentración 0.4 mM dio una mayor respuesta ante la presencia de antracnosis a una temperatura ambiente promedio de 25 °C de esta manera rechazando las hojas contaminadas con antracnosis, en condiciones similares para la variable desprendimiento de frutos, la concentración 0.4 mM también tuvo una mayor cantidad de frutos desprendidos con antracnosis a una temperatura ambiente de 22 °C. Estos acontecimientos presentados del desprendimiento de hojas y frutos, según Malamy y col (1990) menciona que esta restricción se acompaña de muerte localizada (necrosis) de los tejidos del huésped. En conjunto, la restricción de patógenos y la necrosis tisular local caracterizan la respuesta hipersensible (HR). Además de las respuestas de defensa local, muchas plantas responden a la infección activando defensas en partes no infectadas de la planta como resultado, toda la planta es más resistente a una infección secundaria. Esta resistencia adquirida sistémica (RSA) puede persistir durante varias semanas o más y a menudo confiere resistencia cruzada a patógenos no relacionados.

En cuanto a la caracterización molecular del patógeno se probaron primers de ACT, TUB2 y GAPDH para su respectiva amplificación. En el estudio realizado para la caracterización molecular del agente causal de antracnosis dentro del género *Colletotrichum* mediante un análisis multilocus por medio de la evaluación estructurada por los marcadores moleculares usando primers definidos entre ellos: ACT, TUB2 y GAPDH sobre las 16 muestras de ADN de las provincias del Azuay y Loja pertenecientes al sur del Ecuador utilizadas en el estudio por Castro y colaboradores (2019), dieron de manera positiva la amplificación de bandas que demuestran que el género responsable



para *Colletotrichum* es *tamarilloi* dentro del complejo de *Colletotrichum acutatum*, responsable de inducir la enfermedad de antracnosis en el cultivo de tomate de árbol, de tal manera se corrobora esta información en los estudios realizados por Caicedo y col (2017) quienes por medio un análisis molecular por multilocus y utilizando genes de ACT, TUB2 y GAPDH obtuvieron como resultado que *C. tamarilloi* es el hongo responsable de la antracnosis.

En cuanto a la amplificación de bandas, el peso molecular para cada una de los genes utilizados para el análisis multilocus fueron de: ACT (300pb), GAPDH (300pb) y TUB2 (700 pb) los cuales dieron valores similares a los estudios realizados por Caicedo y col (2017), quienes obtuvieron pesos de ACT (316 pb), GAPDH (308 pb) y TUB2 (716 pb) teniendo el 100% de homología con las secuencias dispuestas en Gen Bank en el estudio realizado por Damm y col (2012), quienes a su vez mencionaron que para identificar de manera confiable las especies de *C. acutatum*, los genes apropiados son ACT, TUB2 o GAPDH. Así se determinó que el género causal de antracnosis es *C. tamarilloi* perteneciente al complejo *acutatum* en tomate de árbol, de acuerdo a los resultados de amplificación por PCR. Este estudio complementa los resultados de Castro y col (2019), que realizaron un estudio en las provincias de Azuay y Loja, pero únicamente con primers específicos para *C. acutatum* (CaInt2 - ITS4).



8. CONCLUSIONES

De acuerdo al trabajo realizado se llega a las siguientes conclusiones:

Las diferentes concentraciones de AS usadas en este trabajo como inductor de la RSA contra la antracnosis, tuvieron mayor efectividad en una variable en específico como se menciona continuación:

- La concentración 0.2 mM de AS mostró resultados favorables para la severidad en frutos.
- La concentración 0.1 mM mostró mejores resultados para las variables severidad e incidencia en las hojas frente a las plantas testigo.
- La concentración 0.4 mM incidió un mayor desprendimiento de hojas y frutos contaminados con antracnosis, posiblemente como un mecanismo de defensa ante la enfermedad.

En la caracterización molecular del patógeno se determinó lo siguiente:

- Se comprobó mediante un análisis multilocus por PCR que la especie responsable para antracnosis dentro del género *Colletotrichum* es *C. tamarilloi* dentro del complejo *acutatum*, para las provincias de Azuay y Loja.



9. RECOMENDACIONES

De acuerdo al trabajo realizado se llega a las siguientes recomendaciones:

- Realizar más estudios para evaluar en el campo el efecto del AS en el cultivo de *Solanum betaceum* como inductor de la resistencia a la antracnosis con otras concentraciones. Este estudio podría comprender el efecto de otras concentraciones de AS, ya que posiblemente se necesita de una mayor concentración para determinar su efecto a través del tiempo.
- Realizar pruebas citológicas en hojas y frutos con antracnosis después de haber sido aplicado AS en diferentes concentraciones, para dilucidar las reacciones que se desencadenan a nivel celular, como respuesta a un mecanismo de defensa y resistencia en presencia de la antracnosis en el cultivo de *Solanum betaceum*.



10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta, P. (2011). Caracterización morfológica y molecular de tomate de árbol, *Solanum betaceum*. Recuperado el 5 de junio de 2019. Obtenido de <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1174/1/TSENESCYT-000302.pdf>
- Agrocalidad. (2019). Agro calidad certificó el primer envío de tomate de árbol hacia estados unidos. Recuperado el 3 de junio de 2019. Obtenido de <http://www.agrocalidad.gob.ec/tomate-de-arbol/>
- Alarcón, A. (2012). Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum spp.* asociadas a la antracnosis de *lupinus mutabilis* (chocho) y *Solanum betaceum* (tomate de árbol) en tres provincias del Ecuador. Recuperado el 10 de junio de 2019. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5286/1/T-ESPE-033195.pdf>
- Anculle, y Álvarez. (1999). Evaluación de enfermedades de plantas. Recuperado el 11 de junio de 2019. Obtenido de: http://www.senasa.gob.pe/intranet/capacitacion/cursos/curso_arequipa/evaluacion_enfermedades_plantas_1.pdf
- Barbora y col. (2015). La sensibilidad de *Colletotrichum acutatum* se aísla a fungicidas seleccionados. Recuperado el 15 de junio de 2019. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/281467629_Sensitivity_of_Colletotrichum_acutatum_Isolates_to_Selected_Fungicides
- Botero, M. (2001). Tabla y diagrama de severidad de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en tomate de árbol. Recuperado el 15 de junio de 2019. Obtenido de <http://www.biopsicologia.net/fichas/fic-88-3.html>
- Caicedo, J. D., Lalangui, K. P., Pozo, A. N., Cevallos, P. A., Arahana, V. S., y Méndez, K. S. (2017). Multilocus molecular identificación and phylogenetic analysis of *Colletotrichum tamarilloi* as the causal agent of Tamarillo (*Solanum betaceum*) anthracnose in the Ecuadorian highlands. *European Journal of Plant Pathology*, 148(4), 983-996. Recuperado 03 de marzo de 2019. Obtenido de: <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1155-3>
- Cannon y col. (2012). *Colletotrichum* - estado actual y direcciones futuras. Recuperado el 9 de junio de 2019. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3458418/>
- Castro-Quezada, P., Bravo-Zúñiga, C., Cabrera-Cabrera, A., Quillay-Curay, N., Montoya, M. R., Belesaca-Morocho, I., y Diaz-Granda, L. (2019). Caracterización morfológica y molecular del agente causal de la antracnosis en tomate de árbol en Azuay y Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(1), 1-15.
- Contreras, S., Huamán-Tasa, D., y Noriega, H. (2017). Efecto del ácido acetil salicílico sobre el comportamiento agronómico de la papa (*Solanum tuberosum* L.). 21. https://www.researchgate.net/publication/321599526_Efecto_del_acido_acetil_sal

icilico_sobre_el_comportamiento_agronomico_de_la_papa_Solanum_tuberosum_
L

- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., y Crous, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73(1), 37-113. <https://doi.org/10.3114/sim0010>
- Díaz, D. A. V., Pérez, L. S., Rangel, P. P., Castruita, M. Á. S., Fuentes, J. A. G., y Valenzuela-García, J. R. (2016). Efecto del ácido salicílico en la producción y calidad nutracéutica de frutos de tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 17, 3405-3414.
- Díaz, L. (2012). Resistencia Sistémica Adquirida mediada por el ácido salicílico. Recuperado el 2 de mayo de 2019. Obtenido de http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:F_xdFExUkW8J:www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v10n2/v10n2a30.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=ec
- ESPAC. (2018). Superficie según producción y ventas de tomate de árbol (Fruta fresca). Recuperado el 2 de febrero de 2019. Obtenido de www.ecuadorencifras.gob.ec/.../webinec/...2018/Tabulados%20ESPAC%202018.xlsx
- García y col. (2002). IV Seminario nacional de frutales de clima frío moderado. Recuperado el 12 de febrero de 2019. Obtenido de <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=G8CnojHybXoC&oi=fnd&pg=PA49&dq=tomate+de+arbol+origen&ots=ppk9drN36K&sig=0RN83jb8npDkfQ6aNeTaYpqlI4A#v=onepage&q=tomate%20de%20arbol%20origen&f=false>
- Glaeser y Kämpfer. (2015). Análisis de secuencia multilocus (MLSA) en taxonomía procariota. Recuperado el 10 de mayo de 2019. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25959541>
- Guerber y col. (2003). Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. En *Mycologia* 95 (págs. 872-895).
- INIAP. (2004). Cultivo Ecológico de Tomate de árbol en Ecuador. Recuperado el 12 de marzo de 2019. Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2750/1/iniapscm65.pdf>
- INIAP. (2014). Tomate de árbol. Recuperado el 12 de marzo de 2019. Obtenido de <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/rtomatea>
- Lalangui, K. (2015). Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum spp.*, en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en la sierra ecuatoriana. Recuperado el 1 de marzo de 2019. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/7074/1/T-UCE-0004-32.pdf>
- León, J., y Tamba, M. (2014). Selección de materiales promisorios de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) con resistencia a antracnosis (*Colletotrichum acutatum*), productividad y calidad del fruto. Recuperado el 8 de febrero de 2020. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/2480>



- Liu, P.-P., Bhattacharjee, S., Klessig, D. F., & Moffett, P. (2010). Systemic acquired resistance is induced by R gene-mediated responses independent of cell death. *Molecular Plant Pathology*, 11(1), 155-160. Recuperado el 12 de enero de 2020. Obtenido de: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00564.x>
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., y Raskin, I. (1990). Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250(4983), 1002-1005.
- Mena, E., y Pesántez, E. (2009). Evaluación de alternativas de control de antracnosis (*Colletotrichum Gloeosporioides*) en tomate de árbol. Comunidad Pelileo, Pillaro, Tungurahua. Recuperado el 13 de febrero de 2020. Obtenido de: <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/2605>
- Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., y Inverardi, B. (1990). Increase in salicylic Acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4983), 1004-1006. Recuperado el 10 de febrero de 2020. Obtenido de: <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.1004>
- Narváez, O., y Francisco, J. (2012). Selección de genotipos mejorados de tomate de árbol provenientes de semilla resistentes a antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*). Recuperado el 05 de enero de 2020. Obtenido de: <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/7390>
- Naylor, M., Murphy, A. M., Berry, J. O., y Carr, J. P. (1998). Salicylic Acid Can Induce Resistance to Plant Virus Movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 11(9), 860-868. Recuperado el 25 de diciembre de 2019. Obtenido de: <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.9.860>
- Puentes, D. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. Recuperado el 24 de enero de 2019. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117660>
- Sabadías, A. V. (1995). Estadística descriptiva e inferencial. Universidad de Castilla La Mancha.
- Saldarriaga y col. (2008). Caracterización del Agente Causal de la Antracnosis en Tomate de Árbol, Manzano y Mora. Recuperado el 14 de marzo de 2019. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/257652278_Caracterizacion_del_Agent_e_Causal_de_la_Antracnosis_en_Tomate_de_Arbol_Manzano_y_Mora
- Sánchez y col. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. Recuperado el 16 de marzo de 2019. Obtenido de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Elacidosalic%C3%ADlicoyresistenciaenplantas.pdf>
- Sandoval, M. (2014). elección de materiales promisorios de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) con resistencia a antracnosis (*Colletotrichum acutatum*), productividad del fruto. Recuperado el 15 de marzo de 2019. Obtenido de www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2480/1/T-UCE-0004-72.pdf



- Santamaría, F., Díaz Plaza, R., Gutiérrez Alonso, O., Santamaría Fernández, J., y Larqué Saavedra, A. (2011). Control de dos especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de papaya Maradol. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2(5), 631-643.
- Sharma y Shenoy. (2016). Sistemática de *Colletotrichum*: Pasado, presente y perspectivas. Recuperado el 16 de marzo de 2019. Mycosphere, 7. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/2c/2>
- Shaw, C. (2016). Dinámica de localización de F-actina durante la formación de apresorios en *Colletotrichum graminicola*. Recuperado el 6 de junio de 2019. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26297784>
- Silva, Jéssica, Maria Medeiros, João Oliveira, Erika Medeiros, Cristina Souza, y Keila Moreira. 2018. «Resistance inducers and biochemical mechanisms in the control of anthracnose in cowpea». *Ciencia e investigación agraria* 45(3):290-300. doi: 10.7764/rcia.v45i3.1962.
- Stahl, E., Bellwon, P., Huber, S., Schlaeppli, K., Bernsdorff, F., Vallat-Michel, A., Mauch, F., y Zeier, J. (2016). Regulatory and Functional Aspects of Indolic Metabolism in Plant Systemic Acquired Resistance. *Molecular Plant*, 9(5), 662-681. Recuperado el 13 de enero de 2020. Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.005>
- Vázquez, M. A., Jiménez, S. N., Torres, I., Urrutia, I. A., Mendoza, H. J., & Guevara, R. G. (2012). Behavior of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) sprayed with salicylic acid grown under different climatic conditions in a greenhouse. 9. Recuperado el 1 de febrero de 2019. Obtenido de https://www.uaq.mx/investigacion/revista_ciencia@uaq/ArchivosPDF/v5-n1/articulo6.pdf
- Varela, G. B., Jiménez, V. A. O., Sañudo, R. B., y Martínez, P. G. (2015). Efecto del ácido salicílico en la inducción de resistencia a *Colletotrichum sp.* en frutos de plátano durante postcosecha. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 27-34
- Venancio y col. (2010). Propagación de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) vía embriogénesis somática. Recuperado el 3 de enero de 2019. Obtenido de <http://www.usfq.edu.ec/avances/articulos/B16-2-2010>.
- Viera y col. (2016). Estimación de parámetros de calidad del fruto para segregantes interespecíficos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en respuesta de resistencia a la Antracnosis (*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds). Recuperado el 18 de abril de 2019. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122016000300014&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Zainuri, Joyce, D. C., Wearing, H., Coates, L. M., y Terry, L. A. (2001). Effects of phosphonate and salicylic acid treatments on anthracnose disease development and ripening of «Kensington Pride» mango fruit. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. Recuperado el 12 de febrero del 2020. Obtenido de: <https://doi.org/10.1071/EA99104>

11. FOTOS



Foto 1. Plantación experimental de cultivo de tomate de árbol (Solanum betaceum).



Foto 2. AS pesado en balanza de precisión para cada respectiva concentración a evaluar.



Foto 3. Bomba empleada para la aplicación de AS en frutos y hojas.



Foto 4. Evaluación molecular por análisis multilocus.

12. ANEXOS

Anexos 1. Registro de toma de datos para las variables a evaluar.

Tratamientos	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11
1											
1											
1											
1											
1											
1											
1											
1											
1											
1											
2											
2											
2											
2											
2											
2											
2											
2											
2											
2											
2											
3											
3											
3											
3											
3											
3											
3											
3											
3											
3											
4											
4											
4											
4											
4											
4											
4											
4											
4											
4											